

FACULTE MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

Nº 11

SUR LA DETERMINATION DE
L' ACETONEMIE

THESE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine Générale et Coloniale
et de Pharmacie de Marseille

Le Novembre 1954

PAR

Georges GARRIGUES

né le 14 Septembre 1929 à BEAUCAIRE (Gard).

Pharmacien

ex - chef de laboratoire de la Clinique Obstétricale.

ex - préparateur de cours de Chimie médicale.

ex - aide de laboratoire de Chimie médicale.

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examineurs de la Thèse	(	MM. C. Dumazert, professeur	)	Président
		Y. Derrien, professeur		Assesseurs
		C. Grebus, Agrégé		
		M. Mourgue, Agrégé		

Imprimeur: PEDRO LUIS ESPI
Buenos Aires

1954

Georges GARRIGUES

PHARMACIEN

DOCTEUR EN PHARMACIE

EX-CHEF DE LABORATOIRE DE LA CLINIQUE OBSTÉTRICALE

EX-PRÉPARATEUR DE COURS DE CHIMIE MÉDICALE

EX-AIDE DE LABORATOIRE DE CHIMIE MÉDICALE

SUR LA DETERMINATION DE L'ACETONEMIE

Travail du Laboratoire de CHIMIE de la Faculté
de Pharmacie de Marseille



Parasitologie	RANQUE
Pathologie Chirurgicale	CARCASSONNE
Pharmacologie	MERCIER F.
Pharmacie Chimique et Toxicologie	VIGNOLI
Pharmacie Galénique	DELPHAUT
Physiologie	MORIN
Physique Médicale	DUBOULOZ
Thérapeutique	PIERI
Professeur sans chaire	ROUX

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

MM. BOURRET	MM. MERCIER Jacques
DONNET	MOURGUE
GREBUS	

AGREGES EN EXERCICE

MM. APPAIX	MM. MARONNEAU
BERNARD	MONGES H.
CREMIEUX	OLLIVIER
GRANJON	OURGAUD
HENRY	PAOLI
JOUE	RAYBAUD
LAMY	SERMENT
LAVAL	VAGUE
LENA	

AGREGES LIBRES

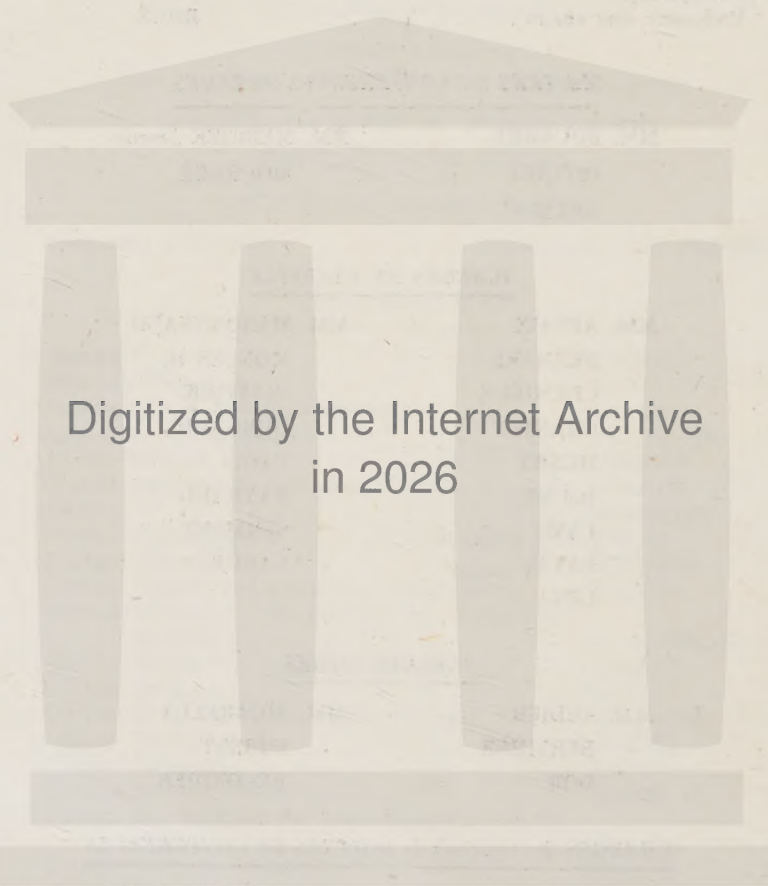
MM. AUDIER	MM. FIGARELLA
BERTHIER	IMBERT
DOR	RECORDIER

CHARGES des fonctions de MAITRES DE CONFERENCES

Anatomie Pathologique	MM. PAYAN
Botanique et Cryptogamie	BERNARD P.
Histologie	STAHL

CHARGES des fonctions d'AGREGES

Clinique Urologique	M. CHAUVIN F.
-------------------------------	---------------



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MES PARENTS

dont la vie est pour moi un modèle incomparable.

Leur existence faite de tendresse, de travail et de dévouement restera pour moi un exemple cher.

En témoignage de ma profonde reconnaissance.

A LA CHÈRE MÉMOIRE DE MES GRANDS-PARENTS

A MA FIANCÉE

A MA SOEUR

Avec toute mon affection.

A MONSIEUR PEDRO LUIS ESPI

*dont l'amitié qui le lie à mon père me vaut
le bonheur de bénéficier de ses inestimables
conseils.*

En témoignage de mon profond respect.

A MONSIEUR JEAN BARD

AGENT-COMPTABLE DE LA CAISSE PRIMAIRE DE LA SÉCURITÉ
SOCIALE DES BOUCHES-DU-RHÔNE

*En reconnaissance de l'intérêt amical qu'il
m'a toujours témoigné.*

A MES AMIS,

et en particulier à Messieurs

A. EL OUACHI, PHARMACIEN; G. VALENSI,
DOCTEUR EN PHARMACIE; C. CHIGLIONE, M. E.
VERMEULEN, TRUONG-VAN-CHOM, DOCTEURS
D'ÉTAT EN PHARMACIE, LICENCIÉS ÈS SCIENCES.

En remerciement de leurs conseils.

A MES CAMARADES des LABORATOIRES

de CHIMIE et de CHIMIE MEDICALE.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J. CHOSSON

PROFESSEUR DE CLINIQUE OBSTETRICALE ET GYNÉCOLOGIE À LA FACULTÉ
DE MEDECINE DE MARSEILLE

*dont j'ai pu apprécier la compétence au
cours du bref séjour qu'il m'a été donné
de faire dans ses services de l'hôpital de la
Conception.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ RECORDIER

*qui m'a ouvert avec bienveillance ses servi-
ces à une époque où mon travail s'ébau-
chait à peine.
Ma profonde gratitude.*

A MON JURY DE THESE,

A MON MAÎTRE, LE PROFESSEUR CHRISTIAN DUMAZERT

PROFESSEUR DE CHIMIE

À LA FACULTÉ MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

dont j'ai l'honneur d'être l'élève.

Les conseils et les encouragements qu'il m'a prodigués au cours des années passées dans ses laboratoires, ont été pour moi les plus précieux des guides; ils m'ont permis de mener à bien cette thèse.

Qu'il veuille bien trouver dans ce travail dont je lui fais hommage, l'expression de toute ma gratitude, de mon entier attachement et de ma respectueuse admiration.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR Y. DERRIEN

PROFESSEUR DE CHIMIE MÉDICALE

À LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

qui m'a fait l'honneur de m'accueillir dans son service.

Je lui dédie très respectueusement ce travail en reconnaissance pour son précieux enseignement et pour la confiance aimable qu'il m'a toujours témoignée.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ C. GREBUS

MAÎTRE DE CONFÉRENCES

À LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

qui me fait l'honneur de siéger à mon jury de thèse.

En hommage reconnaissant pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à mon travail en acceptant de le juger.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ M. MOURGUE

au jugement éclairé duquel nous sommes heureux de soumettre notre travail.

En remerciement du bienveillant intérêt qu'il nous a témoigné au cours de nos études.

AVANT - PROPOS

L'importance du dosage des corps cétoènes (acétone: $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_3$; acide acétylacétique: $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$; acide β -hydroxybutyrique: $\text{CH}_3 \cdot \text{CHOH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$) en biochimie clinique et expérimentale est apparue à la suite de travaux de KNOOP [34] portant sur le métabolisme des acides gras. LYNEN [43] a exposé récemment les connaissances que nous possédons à ce sujet.

La presque totalité des faits expérimentaux exposés par nombre d'auteurs s'explique assez aisément si l'on

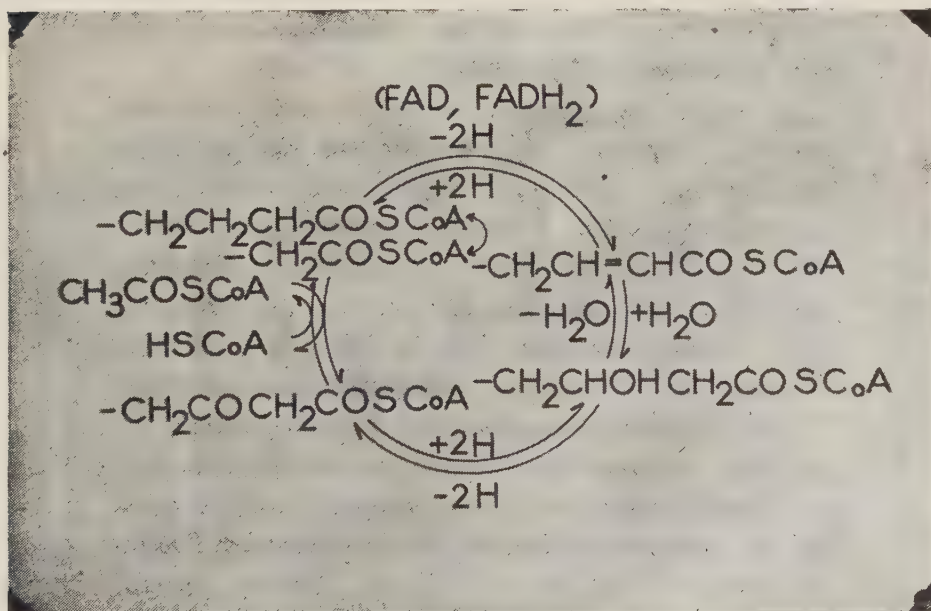


FIGURE 1. — Cycle des acides gras. Le tiret symbolise un atome d'hydrogène ou un radical aliphatique.

admet le schéma du cycle des acides gras. (Voir figure 1 d'après LYNEN).

L'interruption de ce cycle dans le sens anabolique ou catabolique ferait apparaître les corps cétoènes dans le sang ou l'urine d'un sujet diabétique ou soumis à un jeûne glucidique. Un syndrome particulier, l'acidose de diabétique, s'installe; on observe alors une chute de la réserve alcaline et parfois un coma dit acidotique dont l'issue peut être fatale. Certains auteurs [47] n'ont cependant pas observé de relation entre le taux des corps cétoènes sanguins et celui de la réserve alcaline chez le diabétique nettement acidotique. L'acétone, trouvée concurremment dans les humeurs, proviendrait de la décarboxylation de l'acide acétylacétique; selon SAKAMI [59], elle pourrait être métabolisée après coupure en acétate et en formiate.

Ces brèves considérations suffisent à montrer qu'une méthode permettant de doser avec précision les corps cétoènes dans un milieu biologique peut présenter parfois un grand intérêt. Une étude détaillée des différentes théories relatives à la biochimie des corps cétoènes sortirait du cadre du sujet que nous nous sommes proposé. Plusieurs travaux [43 - 54 - 62 - 64] présentent d'ailleurs à ce propos une bibliographie très précise.

Nous limiterons donc notre introduction à l'étude des méthodes de dosage de l'acétone en solution pure; puis nous envisagerons les applications qui en ont été faites par les biochimistes dans le but de déterminer l'acétonémie chez le sujet sain ou diabétique. Nous exposerons, enfin, sous la forme d'un tableau, les résultats obtenus par divers auteurs utilisant diverses techniques.

Introduction

Le dosage de l'acetone en general

Les méthodes mises au point sont pour la plupart excellentes quand il s'agit de doser l'acétone en solution aqueuse. Le problème peut être considéré comme résolu avec l'excellente méthode de MESSINGER et HUPPERT [49] et ses applications microanalytiques.

Malheureusement, dès qu'on cherche à appliquer ces techniques aux milieux biologiques, on se heurte à trois difficultés principales: la première réside dans le fait que ces méthodes exigent des prises d'essai considérables, incompatibles avec leur emploi par le biologiste. Celui-ci travaille sur un matériel, le sang par exemple, dont il ne dispose qu'en quantité faible, limitée soit par la taille de l'animal en expérience (rat, cobaye...), soit par le danger que peuvent présenter des saignées trop abondantes. D'où la nécessité de faire appel à la microanalyse. Celle-ci met en jeu des quantités de sang de l'ordre du centimètre cube.

De ceci découle la deuxième difficulté: les corps céto-gènes n'existent, dans une prise d'essai réduite, qu'à des concentrations trop faibles pour être déterminées avec précision par les méthodes usuelles.

La troisième difficulté découle du fait suivant: la plupart des réactifs utilisés pour le dosage ne jouissent que

d'une spécificité réduite. Il s'agit le plus souvent d'un réactif fournissant au contact de l'acétone un composé insoluble, ou encore réagissant avec les groupements carbonyles libres. Aussi est-il nécessaire, avant d'effectuer le dosage proprement dit, d'éliminer du milieu les substances pouvant interférer dans la réaction; on y parvient souvent par certains procédés de déprotéinisation, mais dans le cas de l'acétone on peut faire appel à la distillation;

Malgré l'existence d'un nombre considérable de techniques permettant de doser l'acétone en solution pure avec une précision suffisante même à l'échelle microanalytique, ces mêmes méthodes appliquées au sang conduisent bien souvent à des résultats décevants.

Dans le premier chapitre de notre introduction nous rechercherons donc parmi les méthodes existantes, une technique susceptible de permettre le dosage microanalytique spécifique de l'acétone en solution pure.

Dans le deuxième chapitre, nous étudierons les techniques permettant de déterminer l'acétonémie dans le but de dégager un mode opératoire permettant de séparer l'acétone d'un milieu biologique sous une forme suffisamment pure.

CHAPITRE I

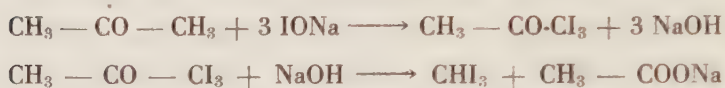
Dosage de l'acetone en solution pure

Nous classerons les principales méthodes existantes selon le principe qu'elles mettent en œuvre; puis nous les décrirons séparément et nous étudierons leur fidélité, leur sensibilité et leur spécificité. Nous envisagerons donc les méthodes fondées sur les principes suivants:

- 1^o oxydation en iodoforme par l'hypoiodite
- 2^o précipitation d'un composé insoluble
 - a) complexe avec le sulfate mercurique
 - b) complexe avec le cyanure mercurique
 - c) complexe avec l'iodomercurate de potassium
 - d) composé d'addition avec le bisulfite de soude
- 3^o dosage titrimétrique par le chlorhydrate d'hydroxylamine
- 4^o formation d'une 2-4-dinitrophényldrazone colorée
- 5^o action du nitro-prussiate de sodium en milieu alcalin
- 6^o condensation en milieu alcalin avec une aldéhyde aromatique ou hétérocyclique, conduisant à différents produits colorés. Dans ces techniques on a surtout fait appel aux substances suivantes:
 - a) l'aldéhyde salicylique
 - b) l'orthonitrobenzaldéhyde
 - c) l'aldéhyde furfurylique

1^o — OXYDATION DE L'ACÉTONE PAR L'HYPŒODITE ALCALIN

LIEBEN [40], en 1870, a le premier mis en évidence la formation d'iodoforme lorsqu'une solution d'acétone est traitée à froid par l'hypoiodite de sodium. La réaction est la suivante:



Ce principe est le plus généralement utilisé quand on désire caractériser ce corps. KRAMER [36], en 1880, étudie les conditions optima de la réaction. MESSINGER et HUPPERT [49], en 1888, présentent une méthode de dosage de l'acétone qui est la plus généralement utilisée. Le mode opératoire en est le suivant:

— à 50 cm³ d'une solution normale de soude, ajouter la solution d'acétone (la prise d'essai devra contenir 30 à 40 mg. de ce corps); puis en agitant, un excès de 25 p. 100 environ sur la quantité théorique d'une solution d'iode décinormale (58 mg. d'acétone correspondent à 60 cm³ de cette solution). Boucher, laisser réagir dix minutes à l'obscurité. Ajouter alors 25 cm³ d'une solution deux fois normale d'acide sulfurique (plus un excès de 0,3 à 0,4 cm³). Titrer l'iode libérée à l'aide d'une solution vingtinormale d'hyposulfite en présence d'empois d'amidon.

Cette méthode met en jeu des quantités d'acétone importantes. Dans ses applications microanalytiques [6 - 13 - 21 - 22 - 23 - 25 - 41 - 42 - 69] elle permet de doser 5 mg. environ de ce corps avec une erreur ne

dépassant pas 5 p. 100. On ne peut doser des quantités inférieures sans nuire à la fidélité de la méthode. Cette méthode est spécifique à condition d'opérer en l'absence d'aldéhyde acétique ou de corps présentant un groupement méthyl-cétonique.

2° — PRECIPITATION D'UN COMPOSE INSOLUBLE

a) Composé d'addition avec le sulfate mercurique

DENIGES [14] signale en 1898 que l'acétone fournit un précipité insoluble au contact d'une solution acide et chaude de sulfate mercurique. Il en détermine la composition [15 - 16] et propose conjointement plusieurs procédés de dosage basés sur le temps d'apparition, la pesée ou le dosage des ions mercuriques de ce précipité; il affirme que sa composition reste rigoureusement constante.

VAN SLYKE [67] modifie en 1917 la technique originale de précipitation, critique le coefficient d'analyse de DENIGES et préfère doser les ions SO_4^- engagés dans le complexe sous forme de sulfate de baryum.

Cette technique n'est considérée par des auteurs plus modernes [21] que comme un moyen commode d'isoler l'acétone d'un mélange complexe et ils préfèrent doser l'acétone engagés par iodométrie. Ce procédé permet de ne pas tenir compte de l'inconstance de la teneur en acétone du précipité qui varierait de 4,5 à 6 p. 100. La limite de sensibilité serait de 1 p. 50.000 [23]. La spécificité de cette réaction n'est pas très grande; elle se révèle positive avec les aldéhydes gras, l'acide pyruvique et ses esters gras, l'acide acétylacétique. Le réactif

est instable en présence de réducteurs qui laissent précipiter du mercure réduit.

b) **Composé d'addition avec le cyanure mercurique**

MARSH et STRUTHERS [46], en 1905, traitant à froid de très faibles quantités d'acétone par du cyanure de mercure en milieu alcalin, isolent un précipité dont la formule brute est $\text{Hg}_3\text{C}_5\text{H}_2\text{N}_2\text{O}$.

MARRIOTT [44], en 1913, puis RIETTI [58] en 1938 utilisent cette méthode pour la détermination de l'acétonémie. Signalons toutefois que FLEURY et AWAD [21] ne la considèrent pas comme spécifique et dosent l'acétone engagée par iodométrie. Sa sensibilité est de l'ordre de celle présentée par la méthode de DENIGES. Enfin sa fidélité peut être influencée par la présence de cyanure alcalin, libéré lors de la formation du précipité, qui ferait passer ce dernier en solution [SCOTT et WILLSON, 60].

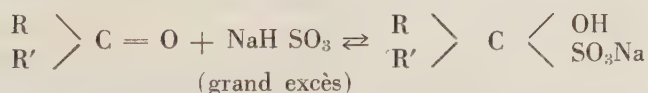
c) **Complexe avec l'iodomercurate de potassium alcalin**
(Réactif de NESSLER).

GILLET [28] montre en 1899 que le réactif de NESSLER fournit, au contact de l'acétone, un précipité insoluble. La plus récente modification proposée est celle de FLEURY et CARBOU [22] qui, en 1938, proposent de doser l'acétone engagée dans le complexe par iodométrie. Ce procédé limite la sensibilité de cette réaction de précipitation qui est grande, quoique discutée (AWAD [2]: $1/400.000^0$; FLOUQUET [23]: $1/100.000^0$). Il permet par contre de remédier à l'absence de spécificité du réactif de NESSLER lequel amène la précipita-

tion sous forme de complexe, de corps aussi divers que l'ammoniac, les aldéhydes, les cétones, les alcools méthylique ou éthylique. Le réactif se révèle d'autre part très sensible à l'action des réducteurs.

d) **Composé d'addition avec le bisulfite de sodium**

Les aldéhydes et certaines cétones, en particulier l'acétone, conduisent sous l'action du bisulfite de soude à la formation d'un dérivé bisulfite insoluble, selon la réaction:

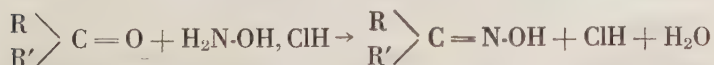


Cette réaction d'équilibre n'est jamais complète, le rendement, pour l'acétone par exemple, est de 56,2 p. 100 en une heure.

JOLLES [33] dose l'excès de bisulfite par iodométrie. LINDENBERG [41-42] présente une méthode complexe et fort longue qui se termine par un dosage iodométrique de l'acétone libérée de son composé avec le bisulfite.

3° — **DOSAGE TITRIMETRIQUE PAR LE CHLORHYDRATE
D'HYDROXYLAMINE**

MAYER [48] présente en 1919 une méthode mettant à profit la propriété commune aux aldéhydes et aux cétones de fournir une oxime avec le chlorhydrate d'hydroxylamine selon le schéma réactionnel suivant:



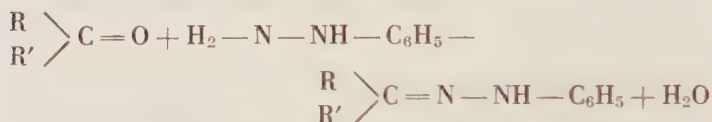
Il titre l'acidité libérée au cours de la réaction.

VALDIGUÏÉ et MESTRE [66] abandonnent l'indicateur coloré au profit d'une titration potentiométrique.

Cette méthode, longue, nécessite dans sa dernière modification un appareillage très spécial et requiert des précautions extrêmes. Elle ne peut être appliquée à une prise d'essai contenant moins de 10 mg. d'acétone. De par le mécanisme qu'elle met en œuvre, sa spécificité est très restreinte.

4^o — FORMATION D'UNE 2.4. DINITRO-PHENYLHYDRAZONE COLOREE

RIEGLER [57], en 1901, applique à l'acétone le principe de la réaction générale de la phénylhydrazine avec les groupements carbonyles selon le schéma :



A la suite des travaux de FRIEDEMANN et HAUGEN [26] qui étudient les propriétés des 2.4.dinitrophénylhydrazones des acides cétoniques du type de l'acide pyruvique, GREENBERG et LESTER [29] établissent une nouvelle méthode de dosage de l'acétone. L'hydrazone formée, fortement colorée, est extraite du milieu réactionnel par le tétrachlorure de carbone et déterminée spectrophotométriquement au sein de ce solvant.

Un avantage remarquable de cette méthode est qu'elle permet de concentrer sous un petit volume un corps fortement coloré qui se forme facilement même dans une solution très diluée d'acétone. La sensibilité absolue de cette méthode est très grande, de l'ordre de 1 p. 200.000.

Sa fidélité est suffisante puisqu'une telle quantité d'acétone peut être déterminée selon les auteurs à 5 p. 100 près. Sa spécificité serait d'après ceux-ci excellente. Cependant nous remarquerons que HAWARY et THOMSON [31] utilisent sensiblement le même principe pour séparer la 2.4.dinitro-phényl-hydrazone de l'acide acétyl-acétique.

5° — ACTION DU NITROPRUSSATE DE SODIUM EN MILIEU ALCALIN

Une solution diluée d'acétone traitée par quelques gouttes d'une solution fraîche de nitroprussiate de sodium à 5 p. 100 et fortement alcalinisée par de la lessive de soude développe une belle coloration rouge qui devient plus intense en présence d'acide acétique. C'est la réaction décrite par LEGAL [38] en 1888.

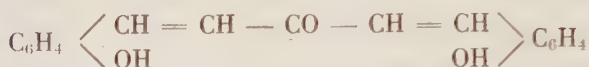
Cette réaction est généralement utilisée pour la recherche qualitative de l'acétone. Sa sensibilité est de l'ordre de 1/20.000ème. Elle a été étudiée dans le but d'effectuer un dosage de l'acétone par colorimétrie. Cependant, le principe de cette réaction est utilisé pour caractériser en analyse organique qualitative les ions sulfure. Sa spécificité est faible puisque, comme l'a montré FLOUQUET [23], cette réaction colorée est fournie par tous les corps présentant un groupement méthylcétonique fixé sur un radical aliphatique; si ce groupement est fixé sur un radical aromatique, la coloration obtenue est bleue.

6° — CONDENSATION EN MILIEU ALCALIN AVEC UNE ALDÉHYDE AROMATIQUE OU HETEROCYCLIQUE

a) Condensation avec l'aldéhyde salicylique

FROMMER [27] décrit, dès 1905, la formation à partir

de l'acétone et de l'aldéhyde salicylique en milieu alcalin d'un produit de condensation coloré en jaune brun, la dihydroxydiphénylacétone de formule:



CSONKA [13], BEHRE et BENEDICT [15], KOREN-MANN [35], CANTONI [8], RAVIN [56]. d'autres encore. ont proposé des méthodes de dosage basées sur ce principe.

La dernière méthode proposée par BEHRE [4] est au point de vue microanalytique la plus largement utilisée. En voici le mode opératoire:

— introduire dans un tube jaugé à 5 cm³ 0,1 cm³ d'aldéhyde salicylique. Ajouter 2 cm³ de la solution acétonique puis 1,5 cm³ d'une solution saturée de potasse, mêler soigneusement, laisser réagir 20 minutes à la température ordinaire. Compléter alors au trait de jauge à l'aide d'une solution d'alcool dans l'eau distillée (75 cm³ d'alcool à 95°, eau distillée q. s. p. 100 cm³). Déterminer la densité au photomètre dans les trente minutes qui suivent à 5.200 Å.

Pour calculer les résultats on se reportera à une courbe étalon préparée dans des conditions rigoureuses et couvrant l'intervalle de 0 à 30 γ.

Il est indispensable que les conditions expérimentales soient uniformes lors de l'étalonnage; elles doivent être reproduites fidèlement pour chaque dosage. Cette méthode est extrêmement sensible; elle permet de déterminer avec une erreur ne dépassant pas 5 p. 100 de 0 à 30 microgrammes d'acétone dans la prise d'essai; le dosage

colorimétrique s'effectue dans des cuves de 2 cm. d'épaisseur à une longueur d'onde de 5.200 Å. Un bon dosage s'effectue sur 5 microgrammes d'acétone. La sensibilité de cette méthode est de l'ordre de 1/200.000ème. De par le mécanisme qu'elle met en jeu cette réaction est spécifique de l'acétone. Cependant sa fidélité peut ne pas être considérée comme suffisante. Les auteurs recommandent en effet de tester périodiquement la courbe d'étalonnage et de la refaire dès que l'on est amené à remplacer l'un quelconque des réactifs. MOURGUE [50] signale d'autre part que l'exécution de la réaction exige l'observation d'une technique opératoire rigoureuse si l'on ne veut voir apparaître des coloration parasites.

b) **Condensation avec l'orthonitrobenzaldéhyde**

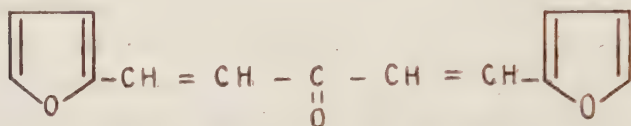
ADAMS et NICHOLLS [1] reprennent en 1929 la très ancienne méthode de PENZOLDT [53] et la rendent quantitative. Elle utilise la formation d'indigo à partir de l'acétone et de l'orthonitrobenzaldéhyde. Cette technique ne semble pas avoir joui de la faveur des analystes.

c) **Condensation avec l'aldéhyde furfurylique**

TSCHELINZEFF et NIKITIN [65] présentent en 1933 une méthode entièrement nouvelle permettant de déterminer de très faibles quantités d'acétone, à l'extrême limite de l'ordre de 1 mg. par litre de solution et ce dans une prise d'essai de 1 cm³. La grande sensibilité de cette méthode, l'extrême spécificité qu'elle présente grâce aux réactions qu'elle met en œuvre, nous ont conduit à l'étudier tout particulièrement.

Nous en décrirons d'abord le principe, puis le mode opératoire proposé par les auteurs.

Principe: La condensation en milieu alcalin de deux molécules d'aldéhyde furfurylique et d'une molécule d'acétone conduit à un corps, la difurfurylidène acétone de formule:



fondant à 61°, et fortement coloré en jaune. Ce corps présente la propriété, quand il est mis en solution dans un acide minéral, de développer une coloration rouge violacée très intense.

Mode opératoire: 1 cm³ d'une solution d'acétone renfermant de 50 à 500 mg. d'acétone par litre est introduite dans un ballon jaugé de 50 cm³ et additionnée de 1 cm³ de solution aqueuse de furfural à 0,2 p. 100 et de 1 cm³ de soude à 5 p. 100. On laisse la condensation s'opérer 45 minutes à 50°C. Passé ce temps, on complète au trait de jauge à l'aide d'une solution à 60 p. 100 (volume à volume) d'acide sulfurique dans l'eau distillée et on compare la coloration obtenue à celle présentée par une solution d'acétone de concentration connue traitée de façon identique.

Cette méthode est limitée dans ses applications par le fait qu'elle ne peut être utilisée en présence de certains corps à caractère réducteur comme le glucose ou les aldéhydes aliphatiques. Les auteurs présentent une méthode d'oxydation assez compliquée permettant d'éliminer ceux-ci au détriment de la sensibilité de la méthode et de la petitesse de la prise d'essai initiale. D'après les auteurs, la spécificité de la réaction est remarquable.

On obtient un corps de composition connue, isolé et soigneusement étudié par les auteurs. Seule l'acétone conduit à sa formation. Dans certaines conditions il fournit une coloration qui est spécifique de l'acétone.

La fidélité de cette méthode est comparable à celle basée sur l'action de l'hypoiodite sur l'acétone; c'est dire qu'elle peut se classer parmi les meilleures. Sa sensibilité est très grande, supérieure à celle présentée par toutes les méthodes envisagées et comparable à celle de la méthode de BEHRE [4].

CONCLUSIONS

Nous avons recherché dans ce premier chapitre de notre introduction une submicrométhode de dosage spécifique de l'acétone. Au terme de cette étude nous pouvons retenir trois méthodes submicroanalytiques: la méthode de GREENBERG et LESTER [29], la méthode de BEHRE [4], la méthode de TSCHELINZEFF et NIKITIN [65]. Seules les deux dernières sont spécifiques de l'acétone. Nous pouvons considérer que la méthode de BEHRE présente une sensibilité maximum de l'ordre de 1/200.000ème. Celle de TSCHELINZEFF et NIKITIN telle qu'elle est décrite ne présente pas une sensibilité supérieure à 1/20.000ème compatible avec un dosage fidèle. Par contre, la technique même utilisée par les auteurs peut faire espérer que toutes les possibilités ne sont pas épuisées et qu'une étude analytique soigneusement conduite peut augmenter notablement la sensibilité de la méthode.

En définitive, nous pouvons retenir la réaction de TSCHELINZEFF et NIKITIN [65] comme susceptible d'être à la base de la détermination de l'acétonémie.

CHAPITRE II

Détermination de l'acétonémie

Cliniquement, l'acétonémie est considérée comme le taux, exprimé en acétone, des corps cétoènes dans le sang. Ces corps sont, rappelons-le, l'acétone, l'acide acétylacétique et l'acide β -hydroxybutyrique.

On peut se demander quelles sont les raisons qui empêchent la détermination de l'acétonémie d'entrer dans la pratique courante du laboratoire d'analyses médicales. Toutes les méthodes de dosage de l'acétone que nous avons passées en revue dans le premier chapitre de notre introduction ont cependant fait l'objet d'application à ce milieu biologique particulièrement intéressant.

Le dosage d'un corps chimique dans un milieu complexe entraîne la nécessité de le purifier d'une façon suffisante; celui-ci ne peut être réalisé qu'après avoir résolu ce problème d'une façon convenable. Nous allons donc rechercher dans la littérature une technique simple permettant de réaliser la séparation quantitative d'un milieu biologique de faibles quantités d'acétone.

La déprotéinisation est un moyen commode de purification largement utilisé; elle entraîne à diluer au dixième environ la prise d'essai initiale. Dans le cas de l'acétone elle laisse dans le milieu une quantité importante de substances susceptibles de réagir à l'égal de

l'acétone avec les réactifs qui ne sont pas spécifiques. C'est le cas des glucides, de l'acide acétylacétique, de l'acide β -hydroxybutyrique avec l'hypoiodite, de l'ammoniac avec le réactif de Nessler, etc.

Parfois certaines substances peuvent troubler le dosage: c'est le cas du glucose dans les méthodes de BEHRE ou de TSCHELINZEFF et NIKITIN. Il convient donc de séparer d'une façon convenable l'acétone du filtrat de déprotéinisation. Cette opération peut être effectuée en précipitant, dans le filtrat de déprotéinisation même, l'acétone, sous la forme d'un complexe insoluble avec un réactif mercurique; ou encore un composé d'addition avec le bisulfite de soude [21 - 22 - 41 - 42]. La séparation quantitative de ce faible précipité, bien que difficile à réaliser, est commode en ce sens qu'elle permet de libérer l'acétone engagée au sein d'un faible volume de liquide où elle est déterminée par iodométrie. Il convient de remarquer qu'un microdosage iodométrique nécessite une quantité d'acétone de l'ordre de 5 mg. dans la prise d'essai. Celle-ci correspond à au moins 10 cm³ de sang, ce qui montre bien que la quantité d'acétone existant dans un litre de sang doit être au moins égale à 500 mg. pour effectuer un dosage correct. Or, il est exceptionnel de rencontrer une telle proportion d'acétone dans le sang si ce n'est au voisinage de la mort par coma acidotique [7 - 45].

Une autre technique, très généralement utilisée pour séparer l'acétone d'un filtrat de déprotéinisation, consiste à distiller ce filtrat. Les corps fixes pouvant interférer

dans le dosage restent dans le ballon. Nous noterons cependant que nombre d'auteurs conseillent de se débarrasser de la plus grande partie de ces corps en déféquant par la chaux et le sulfate de cuivre le filtrat de déprotéinisation avant de le soumettre à la distillation, selon la méthode de VAN-SLYKE [67-68]. La distillation ne peut être appliquée selon divers auteurs [23 - 61 - 69] à des quantités d'acétone inférieures à 5 mg. car elle ne serait alors pas quantitative; cette technique ne peut être utilisée pour la distillation directe du sang ou de plasma car elle donne lieu à la formation de mousses extrêmement abondantes qui gênent considérablement la distillation.

La distillation entraîne la décarboxylation de l'acide acétylacétique en acétone; cet inconvénient se manifesterait dès la température de 34° [17]. Dans le but de remédier à ce grave inconvénient, certains auteurs [2 - 51 - 63] font diffuser l'acétone dans le réactif, l'opération étant conduite dans des unités de CONWAY [10] ou des appareils similaires. Cette méthode est séduisante, bien que ces auteurs ne tiennent pas compte des conditions optima de diffusion déterminées par AWAD [2]. Nous y reviendrons d'ailleurs au cours de nos travaux personnels. D'autres auteurs [17 - 24] préfèrent éliminer l'acétone par des techniques fort longues qui nécessitent un appareillage compliqué.

Cette brève étude montre qu'on ne peut trouver dans la littérature la description d'une méthode simple permettant de séparer quantitativement, puis de doser, des quantités d'acétone de l'ordre du microgramme et même

du milligramme, principalement quand elle se trouve accompagnée par de l'acide acétylacétique ou d'autres corps pouvant interférer. Cela tient:

- 1^o) à des difficultés d'ordre technique qui interdisent la séparation par distillation de faibles quantités d'acétone.
- 2^o) à des difficultés d'ordre analytique: les méthodes utilisées ne sont pas assez sensibles pour déceler de faibles quantités d'acétone.

Cette dernière difficulté est théoriquement résolue par la méthode de BEHRE [4]. On sait que celle-ci permet de déceler 5 microgrammes environ de ce corps. Cependant, elle nécessite une distillation préalable du filtrat de déprotéinisation déféqué au sulfate de cuivre et à la chaux. C'est cela, et cela seul, qui limite sa sensibilité, car la prise d'essai doit contenir au moins 5 mg. d'acétone.

La méthode de GREENBERG et LESTER bien qu'utilisant un réactif non spécifique, permettrait de déterminer l'acétone dans le sang en présence d'acide acétylacétique. Nous avons vu p. 24 la réserve qu'il convient de faire à ce sujet.

En résumé les microméthodes présentées, quand on leur demande de jouir d'une spécificité suffisante, nécessitent l'emploi d'une prise d'essai voisine de 10 cm³ de sang. Elles sont longues et fastidieuses et ne permettent pas de déterminer l'acétone seule dans un milieu biologique mais seulement la somme acétone + acide acétylacétique.

La détermination des corps cétoènes n'est pas plus

aisée puisqu'elle se ramène en définitive à un dosage d'acétone dans un milieu biologique. Cependant le dosage des corps cétoènes en solution pure est aisément réalisable même en présence d'autres corps cétoènes.

- a) l'acétone peut être aisément dosée en présence d'acide acétylacétique par l'excellente méthode d'ENGFELDT [18];
- b) l'acide acétylacétique est décarboxylé en acétone par chauffage en milieu acide et l'acétone dosée dans le milieu neutralisé;
- c) l'acide β -hydroxybutyrique est dosé en présence d'acétone et d'acide acétylacétique, après avoir chassé ces deux derniers par ébullition prolongée en milieu acide [4], par oxydation par le bichromate de potassium en milieu sulfurique [29]: l'acétone formée est distillée et dosée dans le distillat. Dans ce cas, le rendement n'est pas quantitatif [29] mais, dans des conditions déterminées, égal à 86 p. 100 de la théorie.

Nous résumerons maintenant la méthode la plus couramment utilisée en France pour déterminer l'acétonémie au laboratoire d'analyses médicales. Le mode opératoire détaillé est décrit par FIESSINGER [20].

— l'acétone, provenant de l'acétone préformée et de la décarboxylation de l'acide acétylacétique, est déterminée en la faisant distiller, en s'aidant du vide, au sein de 15 cm³ de réactif de NESSLER. On utilise un dispositif spécial analogue à celui décrit par NICLOUX pour déterminer le CO₂ dans le sang. Le précipité est isolé. Il devra peser environ 100 mg. Il correspond à l'acétone contenue

dans 10 à 20 cm³ (suivant la richesse présumée) d'un filtrat de déprotéinisation trichloracétique de sang ou de sérum. La quantité d'acétone engagée dans le complexe est donnée par la formule:

$$p \times 0,0325 = \text{mg. d'acétone dans la prise d'essai.}$$

Le tableau I présente les teneurs en acétone et en corps cétoènes du sang ou du plasma selon différents auteurs utilisant des méthodes diverses.

TABLEAU I

Teneur en acétone et en corps cétoènes du sang ou du plasma (exprimés en mg. par litre) selon divers auteurs et diverses techniques.

Référence bibliogra- phique N°	Acétone	Acide acétylacé- tique	Acide β-hydroxy- butyrique	Acétone + ac. acétyl- acétique (en acétone)	Corps cétogènes totaux (en acétone)
55	0 - 100	8 - 28		20	≤ 200
47*					3 - 20
32		9 - 54	8 - 50		
52					
45			40	15	
45**			450	280	
7**					24 - 640
69					1,8 - 5,2
39*					330
31		2,8			
3	2 - 10			9 - 14	
3*				60 - 106	
12				2,8 - 8	
9				5 - 7	
9*				10 - 46	
37					

* Diabète.

** Coma diabétique.

Objet du travail

Dans une première partie de notre travail nous nous proposons de mettre au point une microméthode spécifique de dosage de l'acétone en solution pure susceptible d'être appliquée à la détermination de l'acétonémie. De notre introduction il ressort que la réaction colorée de TSCHELINZEFF et NIKITIN apparaît comme pouvant être à la base d'une méthode répondant à notre but. Cette réaction n'a pas été étudiée du point de vue purement analytique; aussi nous efforcerons-nous de préciser l'influence, sur la sensibilité de la réaction, des différents facteurs intervenant dans la condensation de l'acétone et du furfurol. Cette condensation conduit, ainsi que nous l'avons vu, à la formation de la difurfurylidène acétone dont le dosage colorimétrique en solution acide termine le dosage. Nous démontrerons au cours de notre travail que cette étude met en évidence l'importance fondamentale de certains facteurs intervenant dans le processus de condensation. Les conclusions que nous tirerons de cette étude expérimentale nous permettront d'augmenter d'une façon notable la sensibilité de la méthode originale.

Nous nous proposons ensuite de résoudre le problème de la distillation quantitative de solutions très diluées d'acétone. Nous avons vu que ce mode opératoire qui théoriquement permet la séparation de l'acétone d'un milieu complexe ne permet pas de récupérer dans le distillat la totalité de l'acétone mise en oeuvre lorsqu'il s'agit de solutions extrêmement diluées. Nous démontrerons que, pour réaliser cette opération, il est nécessaire de faire appel à un protocole expérimental rigoureux,

lequel entraîne l'usage d'un micro-distillateur d'un type particulier. Entre autres avantages, la technique à laquelle nous nous arrêterons nous permettra d'éviter la formation de mousses abondantes qui se produisent avec le sang lorsqu'on utilise un microdistillateur de type courant.

Dans une deuxième partie de notre travail, nous nous proposons de mettre à la portée du laboratoire d'analyses médicales une technique simple et précise susceptible de fournir une donnée nouvelle au clinicien qui désire explorer le métabolisme des glucides et des lipides chez un malade diabétique. Nous montrerons que la simple distillation d'une faible quantité de plasma permet de déterminer, dans un temps très court, le taux exact de la somme acétone + acide acétylacétique.

Enfin, nous pensons ne pas être en droit de négliger l'intérêt que peut présenter en biochimie analytique la détermination précise de l'acétonémie vraie et de l'acide β -hydroxybutyrique dans le plasma. Nous consacrerons la dernière partie de notre travail à l'adaptation et à la simplification de méthodes déjà existantes; nous montrerons, en particulier, que ces méthodes simplifiées rendent facilement réalisable la détermination de l'acétonémie vraie tant chez le sujet sain que chez le diabétique. Aucune des méthodes usuelles n'a jamais permis d'atteindre ce but.

Recherches
Personnelles

PREMIERE PARTIE

Dosage de l'acetone en solution pure

Nous avons retenu au terme du premier chapitre de notre introduction la méthode de TSCHELINZEFF et NIKITIN [65] comme susceptible d'être à la base de la détermination de l'acétonémie. Nous rappelons que dans cette méthode la condensation en milieu alcalin de deux molécules d'aldéhyde furfurylique et d'une molécule d'acétone conduit à la formation de difurfurylidène-acétone. Celle-ci présente en solution alcaline une coloration jaune verdâtre caractéristique qui tient probablement à la présence des doubles liaisons conjuguées; cette coloration devient d'un rouge violacé extrêmement intense quand le milieu est rendu fortement acide par l'acide sulfurique. D'après les auteurs, la difurfurylidène-acétone se transformerait dans ces conditions, en un dérivé du type du fulvène.

Ainsi qu'il ressort de notre introduction, l'étude de la réaction de condensation ne nous a pas paru avoir été menée avec une rigueur suffisante par les auteurs de la technique originale; quelques essais préliminaires nous ont montré que plusieurs facteurs intervenaient dans le processus de condensation de l'acétone avec le furfurol. Ce sont le temps et la température auxquels s'effectue cette condensation ainsi que les proportions relatives de l'agent alcalin, de l'aldéhyde furfurylique et de l'acétone. Nous avons rapidement constaté que l'on avait intérêt à augmenter les quantités de furfural et de soude dans le milieu réactionnel et à diminuer la tem-

pérature à laquelle s'effectue la condensation. En effet en opérant à la température du laboratoire, c'est-à-dire au voisinage de 20°C , nous avons constaté l'apparition dans nos tubes à réaction d'un précipité important, d'aspect microcristallin, dès que l'on utilise des solutions de furfural ou de soude plus concentrées que celles préconisées par TSCHELINZEFF et NIKITIN (voir page 28); ce fait expérimental se traduit par une très forte augmentation de la coloration obtenue après addition de l'acide sulfurique.

Dans le but de rendre nos résultats comparables, nous avons été amenés à choisir un mode opératoire standard: une seule considération nous a guidé dans ce choix: obtenir un volume de liquide juste suffisant pour effectuer un dosage colorimétrique commode. L'étude détaillée des expériences que nous avons effectuées serait fastidieuse. Elle nous a conduit à adopter l'usage de réactifs apportant dans le milieu réactionnel (qui était toujours voisin de 1 cm^3) 1 mg. environ d'aldéhyde furfurylique et 36 mg. de soude.

Voici le mode opératoire que nous avons adopté. Ce mode opératoire implique l'emploi de réactifs très purs, et tout particulièrement l'aldéhyde furfurylique. Il est indispensable de purifier et de conserver le furfurol dans les conditions suivantes [30]:

On distille sous vide au bain de paraffine réglé à 130°C environ, du furfurol technique en rejetant le premier et le dernier quart. Le coeur du distillat, qui passe à 115°C environ est conservé pendant dix à douze mois, sans manifester d'altération notable, en présence de

1 gramme pour mille d'hydroquinone, dans un flacon en verre coloré.

Reactifs

Solution de furfural: aldéhyde furfurylique, 1 g. eau distillée q.s.p. 100 g.

Solution de soude 9 N.

Solution d'acétone pure R.P. titrant 0,5 à 7,5 mg. par litre.

Elles sont préparées au moment de l'emploi à partir de solution stocks d'acétone titrées fréquemment selon la méthode iodométrique de MESSINGER et HUPPERT [49]. (Voir page 20).

Solution d'acide sulfurique dilué - Ce réactif répond à la formule suivante: SO_4H_2 pur $d = 1,83:128$ g. eau distillée, 30 g.

Tous les essais qui vont suivre ont été réalisés de la façon suivante:

— 1 cm^3 de solution titrée d'acétone additionnée de 0,1 cm^3 de solution de soude et de 0,1 cm^3 de solution de furfural est abandonnée, pendant un temps variable, dans un thermostat réglé à une température déterminée. Nous nous proposons en effet d'étudier l'influence du temps et de la température sur la réaction de condensation de l'acétone et du furfural, les conditions de concentration des réactifs étant fixées par ailleurs. Cette première réaction donne lieu à la formation d'une coloration jaune dont le spectre d'absorption dans la lumière visible est représenté dans la figure 2. On ajoute alors un excès d'acide sulfurique dilué soit 5 cm^3 , peu à peu, en agitant et en refroidissant énergiquement au moyen

d'un bain d'eau glacée; il se développe alors une intense coloration rouge violacé dont le spectre d'absorption en lumière visible est représenté dans la figure 2.

Cette coloration finale est très stable; nous pouvons affirmer qu'elle ne subit aucune modification dans la demi-heure qui suit son apparition.

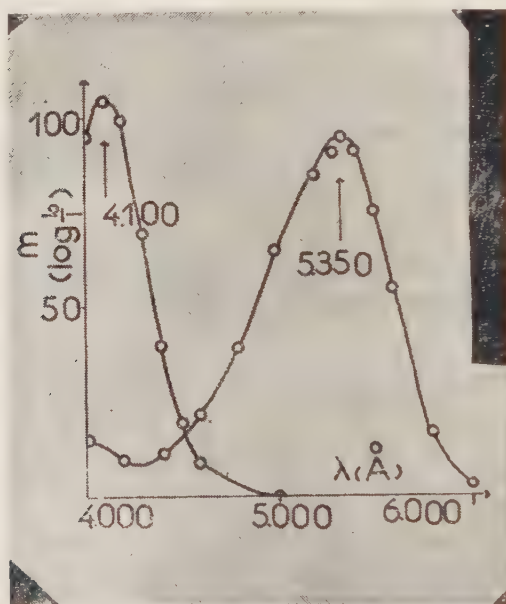


FIGURE 2. — Spectre d'absorption de la difurfurylidène-acétone dans le visible. Courbe A: solution alcaline. Courbe B: solution acide.

L'examen de la figure 2 montre un très net maximum d'absorption lumineuse pour la longueur d'onde de 5.350 Å que nous avons dès lors adoptée pour toutes nos mesures photométriques. La détermination de l'intensité de cette coloration finale nous permettra de juger du ren-

dement de la première réaction (condensation de l'acétone et du furfural en milieu alcalin) en fonction du temps pour une température déterminée. Nous avons étudié ainsi en fonction du temps le rendement de cette réaction de condensation pour les températures suivantes: 0° , 15° , 20° , 25° , 35° centigrades. Pour faciliter les comparaisons, tous les essais ont été réalisés avec des prises d'essai identiques, de 5 microgrammes d'acétone.

La figure 3 résume les résultats de ces expériences.

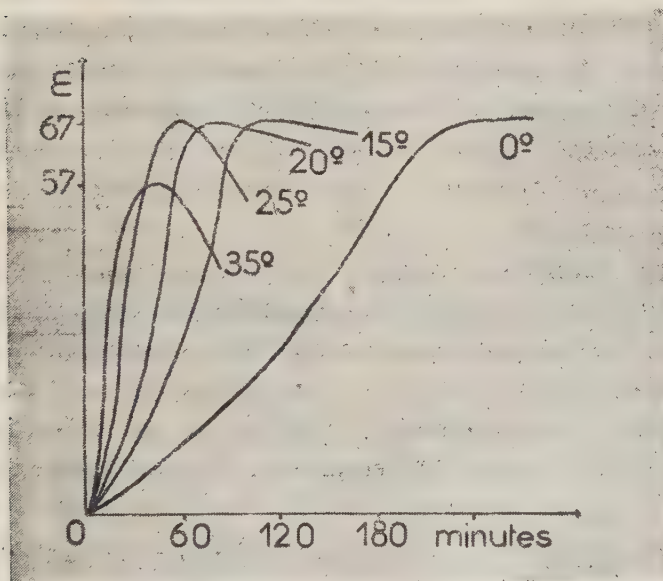


FIGURE 3.— *Intensité de la coloration finale en fonction de la durée de la réaction de condensation réalisée à une température déterminée.*

L'examen de la figure 3 montre que la coloration atteint un plafond au bout d'un temps qui varie suivant la température à laquelle est effectuée la condensation

entre l'acétone et le furfurool. A 0°C la coloration finale rouge est maximum lorsque la réaction de condensation a évolué pendant 250 minutes et reste stable longtemps; à 15°C on aboutit à un maximum identique pour une durée de 90 minutes environ de la réaction de condensation, mais au-delà de 130 minutes on note une diminution de l'intensité de la coloration. Pour une température voisine de 20°C la coloration atteint un maximum toujours de même valeurs dans un temps plus bref, soit 60 minutes environ, mais la coloration s'affaiblit plus rapidement. Ce phénomène est encore plus marqué pour la température de 25°C . Enfin on constate qu'à 35°C le maximum de coloration est obtenu encore plus rapidement (40 minutes) mais il présente une valeur nettement inférieure à celle relative aux températures précédentes.

En résumé nous voyons que pour une température voisine de 20°C le temps durant lequel s'effectue la condensation peut varier de 50 à 80 minutes sans que l'intensité de la coloration finale subisse une variation notable. Nous avons donc adopté une température standard de 22°C ($\pm 2^{\circ}$) et un temps de condensation de 60 minutes ($\pm 5\text{ m.}$).

Ces données nous conduisent à proposer la méthode suivante de dosage de l'acétone en solution pure.

Méthode proposée

Notre technique nécessite l'emploi des réactifs suivants:

- a) Solution d'acétone titrant 0,5 à 7,5 mg. par litre (voir page 45).

- b) Solution extemporanée de furfural: dissoudre 1 cm^3 de ce corps dans 100 cm^3 d'eau distillée.
- c) Solution de soude 9 N.
- d) Acide sulfurique dilué: acide sulfurique pur $d = 1,83$, 128 grammes, eau distillée 30 cm^3 .

Mode opératoire

— ajouter, dans l'ordre, à 1 cm^3 exactement mesuré de solution à doser dans un tube à essai propre et sec, en mélangeant bien chaque fois: solution de furfural $0,1\text{ cm}^3$, solution de soude $0,1\text{ cm}^3$. Abandonner le ou les essais pendant 60 minutes ($\pm 5\text{ m.}$) dans un thermostat réglé à 22°C ($\pm 2^\circ$). Prévoir un essai témoin pour chaque série de dosage.

Passé ce temps, plonger essais et témoin dans un bain d'eau glacée. Ajouter dans chacun, en mélangeant bien 5 cm^3 exactement mesurés de la solution sulfurique préalablement glacée. La densité optique de la solution colorée en rouge violacé, est déterminée au photomètre à une longueur d'onde de $5.350\text{ \AA}$. On utilise des cuves de 1 cm. d'épaisseur (*). On soustrait de chaque mesure la valeur de l'essai témoin. On se reporte alors à une courbe d'étalonnage couvrant la totalité de l'échelle de l'instrument choisi, établie dans les mêmes conditions à

* On peut augmenter sensiblement la fidélité et la sensibilité de la méthode en utilisant des cuves de 2 et même de 5 cm. d'épaisseur pour les quantités d'acétone inférieures à 1 microgramme dans la prise d'essai.

Si la quantité d'acétone est supérieure à 7,5 microgrammes, il suffit de diluer une partie aliquote de la solution colorée et du témoin dans un volume donné d'acide sulfurique dilué répondant à la composition suivante: Acide sulfurique pur $d = 1,83$, 110 grammes, eau distillée 40 cm^3 .

l'aide des solutions étalons d'acétone (voir figure 4 courbes A et B).

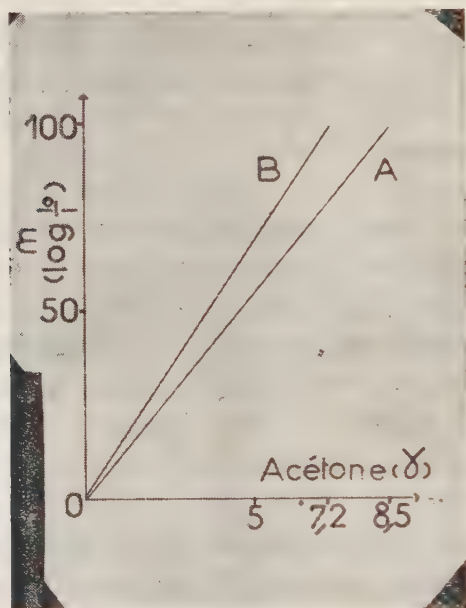


FIGURE 4. — Courbes d'étalonnage. Courbe A: spectrophotomètre de Jean et Constant $\lambda = 5.350 \text{ \AA}$. Courbe B: photomètre de Pulfrich, filtre S. 53.

L'examen de la figure 4 montre que la loi de BEER-LAMBERT est rigoureusement suivie; on note d'autre part, qu'une faible variation de la quantité d'acétone mise en oeuvre se traduit par une variation importante de la coloration finale.

Nous présentons dans le tableau II les résultats que nous avons obtenus par notre méthode en utilisant soit le spectrophotomètre de Jean et Constant, soit le photomètre de Pulfrich.

TABLEAU II

Dosage de l'acétone en solution pure

Acétone mise en œuvre (en γ)	Acétone trouvée (en γ)	Erreur %
1,02	1,02	0
	1,01	- 1
	1,03	+ 1
3,98	3,95	- 0,75
	4,00	+ 0,50
	4,01	+ 0,75
7,02	6,98	- 0,57
	7,08	+ 0,85
	7,04	+ 0,28

De l'examen de ce tableau il ressort que notre méthode nous permet d'obtenir des résultats reproductibles à ± 1 p. 100 près, ainsi qu'en témoignent des essais différents portant sur une même quantité d'acétone.

En résumé, nous avons mis à profit l'extrême sensibilité de la réaction de TSCHLINZEFF et NIKITIN pour mettre au point une technique sub-microanalytique de dosage de l'acétone en solution pure. La technique proposée permet de doser (lorsqu'on l'applique à une solution pure contenant de 0,2 à 200 milligrammes d'acétone par litre de solution), de 0,2 à 200 microgrammes d'acétone dans une prise d'essai de 1 cm³ avec une précision de ± 1 pour 100. Nous insistons sur le fait que la précision dépend essentiellement de la durée de la réaction de condensation entre l'acétone et le furfurole pour une température donnée.

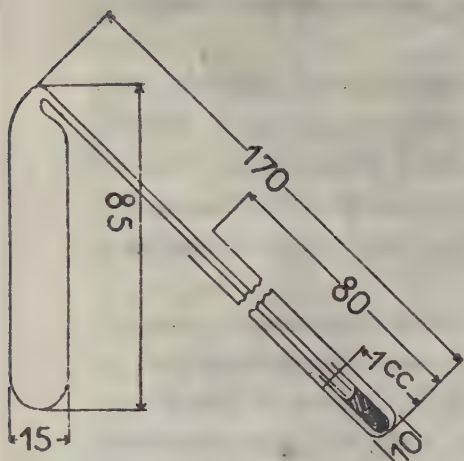
Sur la distillation des solutions très diluées d'acétone

Nous savons que la distillation, appliquée à la séparation d'un corps volatil, est une méthode très largement utilisée. Nous avons vu les difficultés rencontrées par plusieurs auteurs [23 - 61 - 69] lors de la séparation par cette technique de très faibles quantités d'acétone. Certains auteurs se sont efforcés de remédier à ces inconvénients en faisant diffuser l'acétone dans le réactif. L'opération est conduite dans des unités de CONWAY [10].

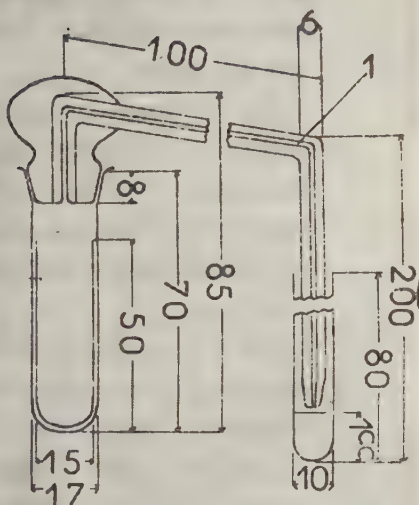
Nous avons cherché à appliquer cette technique séduisante à la séparation de faibles quantités d'acétone en solution pure en nous inspirant des travaux de THIN et ROBERTSON [63]. Nous avons fait diffuser l'acétone au sein du réactif piège répondant à la composition suivante: eau distillée 1 cm³, solution de furfurol à 1 p. 100 0,1 cm³, solution de soude 9N 0,1 cm³; le rendement atteint 15 p. 100 de la théorie quand nous laissons la diffusion s'opérer 60 m. à 25° au sein d'une unité de CONWAY. Devant ces résultats peu satisfaisants, nous nous sommes proposés de résoudre le problème de la distillation quantitative de faibles quantités d'acétone.

Nous avons pensé à embarrasser l'appareil par une substance inerte dont le but serait d'augmenter la surface d'évaporation et à appliquer au sommet de cette sorte de colonne une substance largement poreuse contre laquelle viendraient se briser les mousses. Celles-ci sont fort gênantes dans un appareil du type de celui utilisé par SHIPLEY et LONG [61]. Nous avons utilisé au cours de cette étude trois types de très petits appareils distillatoires

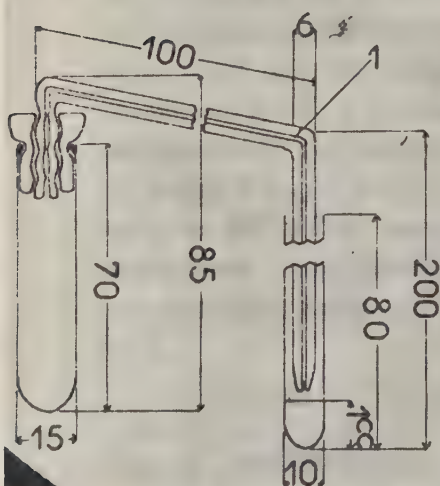
Appareil N°1



Appareil N°2



Appareil N°3



Appareil N°4

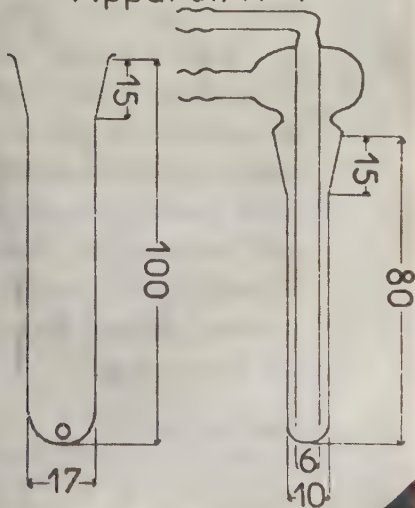


FIGURE 5. — Schéma des Appareils. Les côtes sont indiquées en millimètres. Les appareils sont représentés demi-grandeur naturelle.

qui se sont révélés satisfaisants à l'usage. Nous allons les décrire brièvement car nous pensons que les schémas présentés dans la figure 5 seront plus explicites qu'une longue discussion.

Ces appareils se composent essentiellement de trois parties: un récipient en verre pyrex destiné à recevoir la solution d'acétone; un tube à dégagement à lumière semicapillaire qui fonctionne comme réfrigérant à air; un tube récepteur du distillat jaugé assez exactement à 1 cm³.

Dans l'appareil n° 1 le tube à dégagement est engagé dans un fragment de canne de verre introduit au fond du récepteur. Cet artifice limite le volume du liquide qui est aspiré lorsque l'appareil subit un léger refroidissement. Il va de soi que le tube à dégagement capillaire n'est confectionné qu'*après* avoir chargé l'appareil comme indiqué ci-dessous. Dans l'appareil n° 2 la cartouche est chargée séparément et on l'introduit dans l'appareil. Le bouchon est assis fortement sur son siège après avoir été modérément graissé. L'appareil n° 3 est exécuté au laboratoire. Il comporte un bouchon en caoutchouc de bonne qualité percé d'un trou dans lequel s'engage le tube à dégagement. Dans les appareils 2 et 3 il est indispensable de maintenir l'extrémité du tube à dégagement au-dessus du trait de jauge de manière à éviter tout risque d'aspiration.

Mode opératoire

On introduit au fond du micro-distillateur un cm³ exactement mesuré de la solution acétonique. On recouvre le liquide de sable grossier (1 à 2 mm. de dia-

mètre), lavé et séché. On ajoute au-dessus deux grammes environ de sulfate de calcium anhydre qui, en cristallisant, formera joint; on ajoute au-dessus une couche de 1,5 mm. environ de sable. L'appareil est ainsi embarrassé presque complètement par du sable grossier. Les vapeurs ne pourront donc stationner dans l'appareil au cours de la distillation. L'appareil est monté selon les indications de la figure 5 et maintenu en place par des pinces. Le tube récepteur est plongé dans un bain de glace fondante. Le micro-distillateur est plongé dans un bain d'huile maintenu à 70° C. environ. *Le niveau de ce bain sera réglé de telle sorte qu'il n'existe pas plus de quatre centimètres entre le niveau de l'huile et la partie la plus haute du tube à dégagement.* On augmentera progressivement la température de ce bain. On atteint: — 110° en 5 m. environ; les premières gouttes commencent à distiller.

— 130° en 15 m. environ; la presque totalité de la solution a alors distillé. On chasse dans le récepteur les dernières gouttes de distillat qui séjournent dans le tube à dégagement en chauffant la partie inclinée de ce dernier avec un petit bec Bunsen (sauf en ce qui concerne l'appareil n° 1). Trente minutes se sont alors écoulées; on détache les tubes récepteurs et on complète à un centimètre cube au moyen d'eau distillée le volume du distillat.

Le dosage de l'acétone est alors effectué dans le distillat comme indiqué page 48 pour l'établissement de la gamme d'étalonnage.

Quelques essais préliminaires nous ont convaincu que l'on ne pouvait effectuer la distillation quantitative de

faibles quantités d'acétone qu'à la condition d'observer rigoureusement les conditions opératoires que nous décrivons. Par exemple, si l'on plonge le micro-distillateur dans un bain d'huile dont la température est supérieure à 70° C., on observe une ébullition tumultueuse de la solution acétonique qui peut amener le bris du tube: d'autre part si l'on ne porte pas progressivement la température du bain au voisinage de 130° C. le rendement de l'opération dépend essentiellement de l'appareillage utilisé et du temps durant lequel s'effectue la distillation. Nous avons donc étudié, en fonction du temps, la vitesse à laquelle distillent de faibles quantités d'acétone en observant rigoureusement les conditions opératoires

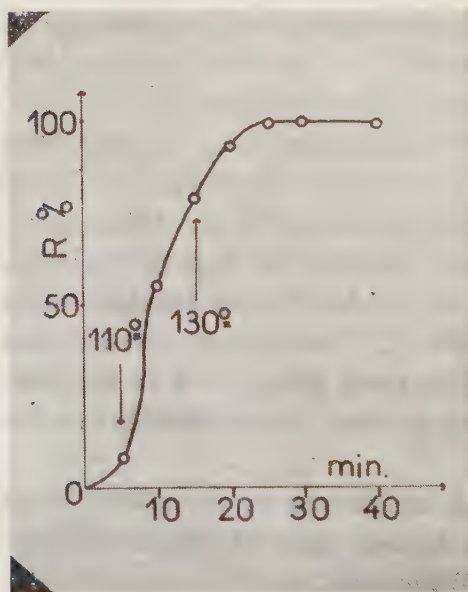


FIGURE 6. — Acétone distillée en fonction du temps. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'acétone mise en œuvre.

auxquelles nous nous sommes arrêtés. Les essais que nous avons effectués portaient sur 5 microgrammes d'acétone. Les résultats que nous avons obtenus sont représentés graphiquement dans la figure 6.

L'examen de la figure 6 montre qu'il est nécessaire d'effectuer la distillation d'une solution très diluée d'acétone pendant 30 minutes, dans les conditions opératoires que nous préconisons.

Nous avons appliqué notre technique à des solutions pures d'acétone de titre connu. Nous présentons dans le tableau III les résultats que nous avons obtenus.

TABLEAU III
Dosage de l'acétone par distillation

Acétone mise en œuvre (en γ)	Acétone trouvée (en γ)	Erreur %
1,20	1,10	— 8
	1,25	+ 4,1
1,45	1,35	— 6,9
	1,45	0
2,05	2,15	+ 4,9
	2,00	— 2,2
4,30	4,40	+ 2,3
	4,20	— 2,3
	4,25	— 1,15
	4,45	+ 3,5
	4,25	+ 1,2
4,20	4,40	+ 4,7
	4,75	— 1,10
4,80	5,00	+ 4,2
	4,90	+ 2,08
7,01	7,00	0
	7,10	+ 1,4
7,20	7,35	+ 2,4
	6,8	— 5,5

De l'examen du tableau III il ressort que notre technique de distillation, appliquée à des solutions pures d'acétone, permet de retrouver toute l'acétone mise en oeuvre avec une erreur de ± 5 pour cent. Cette erreur est supérieure à celle que nous notons lorsque nous effectuons le dosage de l'acétone en solution pure sans distillation. Cela tient, d'après quelques essais que nous avons effectués, à la difficulté que l'on éprouve de régler exactement à un centimètre cube le volume du distillat.

CONCLUSIONS

Notre technique de dosage de l'acétone peut être appliquée au dosage de l'acétone récupérée d'un milieu complexe, à la condition d'effectuer la distillation de l'acétone au moyen des appareils et selon la technique que nous venons de décrire dans le présent chapitre.

DEUXIEME PARTIE

Détermination de l'acétonémie

SUR LE PRELEVEMENT ET LA CONSERVATION DE L'ECHANTILLON DE SANG

Il est rare qu'au laboratoire d'analyse médicale le dosage soit effectué immédiatement après le prélèvement. Or, dans le sang abandonné à lui-même l'acétone et les corps cétoènes peuvent disparaître assez rapidement; c'est pour cela que FRIEDEMANN [25] recommande d'effectuer le prélèvement dans des conditions d'asepsie convenables de façon à éviter la contamination de l'échantillon par les micro-organismes qui, dans certaines conditions, attaqueraient les corps cétoènes. L'échantillon est donc reçu dans un récipient stérile sur 20 mg. environ de fluorure de sodium pour dix centimètres cube de sang et la détermination de l'acétonémie effectuée le plus rapidement possible. Nous nous sommes conformés aux indications données par cet auteur mais au cours de notre travail nous avons constaté qu'on pouvait conserver sans inconvénients l'échantillon quatre heures environ au frigidaire. Passé ce temps nous avons observé, même si l'échantillon est maintenu dans un tube hermétiquement bouché et complètement rempli, des pertes dont nous ne pouvons prédire l'ordre de grandeur.

Nous utiliserons dans la suite de ce travail le plasma obtenu après centrifugation de l'échantillon.

SUR L'APPLICATION DE LA REACTION DE TSCHELINZEFF ET NIKITIN A LA DETERMINATION DE L'ACETONEMIE

Au terme de la première partie de notre travail relatif au dosage de l'acétone en solution pure, nous avons atteint à un résultat particulièrement important à savoir

effectuer la distillation quantitative et le dosage dans le distillat de faibles quantités d'acétone (de l'ordre du microgramme) avec une erreur ne dépassant pas ± 5 pour cent. La technique que nous avons établie, entre autres avantages, empêche complètement la formation de mousses; celles-ci, nous l'avons vu, gênent considérablement la distillation dans les appareils de type courant, en particulier quand on se propose de distiller un liquide biologique, par exemple le plasma. Enfin le dosage proprement dit s'effectue sur une prise d'essai de un centimètre cube. Cette prise d'essai est de l'ordre de celle que l'on utilise, dans les analyses biologiques, dans la majorité des microméthodes.

A) Comment ne pas envisager dès lors la possibilité de déterminer l'acétonémie par simple distillation du plasma selon la technique que nous avons élaborée?

Le but que nous nous proposons d'atteindre nous a amené à choisir un protocole expérimental susceptible de permettre un contrôle rigoureux des résultats de nos expériences. Nous avons vu, en effet, dans notre introduction, qu'aucune des méthodes usuelles de détermination de l'acétonémie n'était susceptible de nous servir de méthode de référence, principalement quand on se propose de les utiliser pour déterminer de faibles taux d'acétone, de l'ordre de ceux que l'on peut trouver dans le sang d'un sujet sain. D'autre part, le prélèvement répété sur des sujets hospitalisés des quantités de sang nécessaires à nos expériences s'est avéré peu aisé. Nous nous sommes donc proposé d'utiliser du sang animal prélevé au abattoirs et de l'enrichir en acétone par

un moyen convenable. Le mode opératoire auquel nous nous sommes arrêtés nécessite l'emploi des réactifs suivants:

- a) solution d'acétone dans l'eau physiologique titrant environ 750 mg. par litre. Son titre exact est déterminé au moment de l'emploi par la technique iodométrique de MESSINGER et HUPPERT [49] modifiée par FLOUQUET [23].
- b) plasma de cheval que nous séparons par centrifugation du sang prélevé aux abattoirs dans les conditions que nous avons décrites.
- c) réactifs pour le dosage de l'acétone en solution pure (voir page 48).

Mode opératoire

Nous enrichissons le plasma de cheval à l'aide de la solution concentrée d'acétone dont nous nous proposons d'étudier le comportement au cours de la distillation; pour cela nous introduisons un cm^3 exactement mesuré de la solution concentrée de ce corps dans un ballon jaugé et nous complétons au trait de jauge avec le plasma, puis nous mélangeons soigneusement. Nous effectuons la distillation simultanée de un centimètre cube de plasma enrichi et de un centimètre cube de plasma non enrichi. Ce procédé nous permet de retrancher l'apport en acétone du plasma utilisé. Nous suivons rigoureusement la méthode de distillation que nous avons mise au point et que nous présentons page 54.

Nous donnons dans le tableau IV les résultats que nous avons obtenus.

TABLEAU IV

Distillation du plasma enrichi en acétone

Acétone mise en oeuvre (en γ par cm^3) (a)	Acétone fournie par le plasma seul (γ par cm^3) (b)	Acétone retrouvée en γ (a-b)	Erreur %
1,60	0,45	1,65	+ 3,7
		1,50	- 7,5
		1,55	- 3,75
3,20	1,32	3,20	0
		3,25	+ 1,75
4,80	1,32	4,60	- 4
		4,90	+ 2
8,00	6,00	7,95	- 1
		7,90	- 2

De l'examen du tableau IV il ressort que la simple distillation de un centimètre cube de plasma enrichi permet de retrouver la totalité de l'acétone mise en oeuvre avec une erreur maxima de ± 5 pour cent. La fidélité de cette technique est très satisfaisante ainsi qu'il ressort de la comparaison de plusieurs résultats obtenus à partir d'un même plasma enrichi en acétone. On notera cependant que la simple distillation du plasma animal non enrichi met en évidence l'existence dans celui-ci de faibles quantités d'acétone. Dans notre introduction, nous avons vu qu'une faible élévation de température peut entraîner la transformation de certains corps céto-gènes en acétone. Nous nous sommes donc proposés d'étudier le comportement de ces corps lorsqu'ils sont soumis à la distillation.

Dans cette partie de notre travail nous avons utilisé du plasma animal enrichi selon le protocole que nous décrivons ci-dessus. Ce mode opératoire implique alors l'usage des réactifs suivants:

- a) Solution d'acide acétylacétique (sel de sodium) dans l'eau physiologique préparée selon la méthode d'ENGFELDT [19] par saponification de l'ester éthylique de cet acide. De mauvaise conservation, nous la renouvelons fréquemment; nous la débarrassons au moment de l'emploi de l'acétone formée par lavage en milieu alcalin par le chloroforme, selon FLOUQUET [23]. Nous déterminons son titre en acide acétylacétique par la méthode d'ENGFELDT [18]. Ce titre sera voisin de 750 mg. par litre exprimé en acétone.
- b) Solution d'acide β -hydroxybutyrique dans l'eau physiologique; nous la préparons en pesant extemporanément environ 1 gramme 50 de sel de sodium de l'acide racémique (BRITISH DRUG HOUSE), que nous dissolvons dans un litre d'eau physiologique.
- c) Plasma de cheval.
- d) Réactifs pour le dosage de l'acétone en solution pure (voir page 48).

Nous effectuons la distillation simultanée de un centimètre cube de plasma enrichi et de un centimètre cube de plasma non enrichi de façon à pouvoir soustraire des résultats trouvés l'apport en acétone du plasma seul. Ce sont ces résultats "nets" que nous présenterons.

B) Distillation du plasma enrichi en acide acétyl-acétique

Nous présentons dans le tableau V les résultats que nous avons obtenus.

TABLEAU V

Distillation du plasma enrichi en acide acétyl-acétique

Acide acétylacétique mis en œuvre (en γ d'acétone par cm ³)	Acide acétylacétique retrouvé (en γ d'acétone)	Erreur %
0,82	0,90	+ 9,75
0,88	0,95	+ 8,0
1,75	1,65	— 5,70
4,32	4,25	— 1,62
7,66	7,80	+ 1,82

L'examen du tableau V montre que la distillation de un centimètre cube de plasma enrichi en acide acétylacétique transforme quantitativement cet acide cétonique en acétone. L'erreur de l'ordre de dix pour cent que l'on observe dans les deux premiers dosages tient à ce que nous n'avons pu disposer de cuves de 2 cm. d'épaisseur pour effectuer le dosage colorimétrique (voir note page 49).

C) Distillation du plasma enrichi en acide β -hydroxybutyrique

Au terme de nombreux essais portant sur la distillation du plasma enrichi en acide β -hydroxybutyrique nous n'avons pas trouvé que ce corps se transforme dans ces conditions en acétone. Nous avons d'autre part vérifié que la présence d'acide β -hydroxybutyrique dans du plasma contenant un taux connu d'acétone ou d'acide

acétyl-acétique ne nuit pas au dosage de l'acétone dans le distillat.

La distillation du plasma par la technique que nous avons mise au point n'offre aucune difficulté; le liquide ne mousse pas et à la température de 130°C que nous atteignons et maintenons les matières organiques du plasma non plus que l'acide β -hydroxybutyrique ne fournissent aucun composé volatil susceptible d'entraver la réaction colorée. La distillation directe de un centimètre cube de plasma est donc éminemment recommandable par sa simplicité et sa facilité d'exécution. *Elle fournit dans un temps très court le taux très exact de la somme acétone + acide acétylacétique exprimé en acétone.*

SUR LA DETERMINATION DE L'ACETONEMIE VRAIE

Le dosage spécifique de l'acétone dans le plasma peut présenter dans certaines recherches biologique précises un certain intérêt; en particulier il serait intéressant de disposer d'une technique permettant la détermination exacte de l'acétonémie chez un sujet sain ou diabétique. Aucune des méthodes existantes ne permet de préciser de telles données (voir tableau I).

Nous avons vu que la simple distillations du plasma conduit à la décarboxylation quantitative de l'acide acétyl-acétique en acétone. Parmi les méthodes permettant d'éliminer cet acide cétonique, nous avons retenu la méthode d'ENGFELDT [18]; celui-ci détruit l'acide acétyl-acétique par oxydation à chaud par le permanganate en milieu acide. Dans ces conditions l'acétone n'est pas détruite mais nous avons trouvé que ce mode opératoire transforme partiellement l'acide β -hydroxybutyrique en acétone. Quelques essais préliminaires nous ont montré que le rendement de cette opération peut atteindre 30 pour cent de la théorie, mais que si on opère à une température plus basse et en milieu faiblement acide cet inconvénient ne se manifeste plus. Nous allons décrire la technique à laquelle nous nous sommes arrêtés. Nous avons utilisé dans cette partie de notre travail du plasma enrichi préparé selon les indications que nous donnons

page 63.

Méthode proposée

Réactifs

Solution de tungstate neutre de sodium à 5 pour cent.

Solution d'acide sulfurique 1/3 normal.

Solution saturée à froid de permanganate de potassium.

Solution d'acide sulfurique 5N. environ.

Acide oxallique pur cristallisé.

Réactifs pour le dosage de l'acétone en solution pure (voir page 38).

Mode opératoire

— à 2,5 cm³ d'eau distillée, ajouter 0,5 cm³ de plasma puis 1 cm³ de solution de tungstate de sodium et 1 cm³ d'acide sulfurique 1/3 normal; mélanger soigneusement. Filtrer ou centrifuger. 1 cm³ de liquide clair mesuré avec précision *dans l'appareil distillatoire* est additionné de 2 gouttes de la solution de permanganate et de 1 goutte d'acide sulfurique 5N environ. Le ou les essais sont maintenus 15 m. environ à 50°C (± 5°), puis l'excès de permanganate réduit au moyen d'un petit cristal d'acide oxallique. Le microdistillateur est alors refroidi et le dosage de l'acétone effectué par distillation comme indiqué page 33.

Nous présentons dans le tableau VI les résultats que nous avons obtenus. Nous en avons déduit l'acétone dosable, par cette même technique, dans un filtrat de déprotéinisation de plasma non enrichi.

TABLEAU VI

* Détermination de l'acétonémie vraie

Mélange réalisé (en γ par cm ³ de fi'trat)		Acétone (γ) trouvée	Erreur %
Acétone	1,20	1,15	— 4,2
		1,10	— 8,4
Ac. acétylacétique	12,50		
Ac. β -hydroxybutyrique ..	23		
Acétone	4,80	4,90	+ 2,04
		4,60	— 4,25
Ac. acétylacétique	18,30		
Ac. β -hydroxybutyrique ..	23		
Acétone	7,90	8,10	+ 2,5
		8,00	+ 1,25
Ac. acétylacétique	28		
Ac. β -hydroxybutyrique ..	46		

De l'examen du tableau VI il résulte que notre technique de dosage de l'acétone en présence d'autres corps cétoènes permet de retrouver la totalité de l'acétone mise en œuvre aux erreurs d'expérience près. La présence de fortes quantités d'acides acétylacétique et β -hydroxybutyrique ne gêne pas le dosage colorimétrique. Cette méthode permet d'effectuer la détermination de l'acétonémie vraie. Ce résultat, rappelons-le, n'a jamais été obtenu même au moyen de certaines techniques beaucoup plus fastidieuses que celle que nous proposons. Nous ferons enfin remarquer que la détermination simultanée de la somme acétone plus acide acétylacétique et de l'acétone seule, permet de calculer, par différence, le taux de l'acide acétylacétique dans le plasma.

SUR LA DETERMINATION DE L'ACIDE β -HYDROXYBUTYRIQUE

DANS LE PLASMA

La détermination du taux de l'acide β -hydroxybutyrique dans le plasma a retenu l'attention d'un certain nombre d'auteurs. Elle met en œuvre la décarboxylation oxydative de cet hydroxy-acide en acétone au moyen d'un réactif sulfochromique suffisamment dilué et à la température de l'ébullition. Dans des conditions bien définies l'acétone n'est pas détruite; d'autre part, l'acide acétylacétique est transformé quantitativement en acétone [5 - 23 - 29 - 63 - 69]. On voit que dans ces méthodes l'acide β -hydroxybutyrique ne peut être déterminé que par différence. La plupart des techniques opératoires proposées sont fastidieuses, l'appareillage incommode [4 - 5 - 11 - 12 - 24 - 29 - 37 - 39 - 61 - 69]. D'autre part, elles ne permettent pas de réaliser la transformation quantitative de l'acide β -hydroxybutyrique en acétone. GREENBERG et LESTER [29] décrivent une technique compliquée qui permet d'effectuer cette transformation avec un rendement constant et égal à 86 p. 100 de la théorie. Quelques essais préliminaires nous ont montré que l'on pouvait considérablement simplifier et l'appareillage et la technique d'oxydation elle-même.

Nous avons donc fait exécuter un micro-appareil dont nous présentons le schéma dans la figure 5 (appareil n° 4). La méthode à laquelle nous nous sommes arrêtés n'implique d'autre part que l'emploi d'un seul réactif. Nous avons utilisé dans cette partie de notre travail du

plasma enrichi préparé selon les indications que nous donnons page 63.

Méthode proposée

Réactif

- Solution M/100 de bichromate de potassium dans l'acide sulfurique 7N.

Mode opératoire

— 1 cm³ de filtrat de déprotéinisation (obtenu selon la technique que nous décrivons page 69) est introduit avec précision dans le tube de l'appareil n° 4 qui contient une bille de verre. On ajoute exactement 0.5 cm³ de réactif sulfochromique. On met en place le petit réfrigérant en doigt de gant après avoir *très modérément* graissé le rodage. L'oxydation est conduite en maintenant (20 minutes environ) dans l'appareil une douce ébullition au moyen de la veilleuse d'un bec Bunsen. Le tube est alors refroidi et son contenu soigneusement homogénéisé. Le dosage de l'acétone formée est effectué après distillation de 1 cm³ exactement mesuré de ce liquide selon les indications de la page 48. Le résultat obtenu, multiplié par le coefficient 1.5 donne la quantité d'acétone formée par cm³ de filtrat de déprotéinisation.

Nous présentons dans le tableau VII les résultats que nous avons obtenus. Nous en avons déduit, comme précédemment l'acétone dosable par cette même technique dans un filtrat de déprotéinisation non enrichi.

TABLEAU VII

Détermination de l'acide β -hydroxybutyrique dans le plasma

Acide β -hydroxybutyrique soumis à l'oxydation (en γ)	Acide β -hydroxybutyrique retrouvé (en γ)	Rendement %
2,55	2,20	86
5,01	4,25	85
7,56	6,57	87
22,68	19,30	85
45,36	38,40	86

De l'examen du tableau VII il ressort que la technique que nous proposons permet d'obtenir, comme dans la méthode de GREENBERG et LESTER, un rendement constant en acétone égal à 86 pour cent de la théorie. Notre technique présente sur la méthode antérieure des avantages non négligeables; ceux-ci se caractérisent principalement par une grande simplicité du matériel et des réactifs utilisés.

Nous remarquerons pour terminer que la détermination simultanée de la somme acétone + acide acétylacétique et de l'acétone dosable par oxydation sulfochromique permet de calculer par différence et en appliquant des coefficients convenables le taux de l'acide β -hydroxybutyrique dans le plasma ainsi que la somme des corps cétoènes d'un plasma donné exprimée en acétone.

Conclusions

Nos conclusions seront brèves.

Notre travail nous a permis de mettre au point un submicrodosage de l'acétone en solution pure. La technique que nous proposons met en œuvre le dosage colorimétrique du produit de condensation de l'acétone avec le furfural; ce produit est la difurfurylidène-acétone qui présente, quand elle est mise en solution dans l'acide sulfurique dilué, une coloration rouge violacé très intense. Le principe de cette réaction a déjà été mis en œuvre par TSCHELINZEFF et NIKITIN. Leur méthode ne nous est cependant pas apparue avoir acquis la faveur des analystes: excellente en solution pure, elle nécessite pour être appliquée à un milieu complexe de détruire au préalable, par oxydation, les substances à caractères réducteurs; sans doute la technique décrite a-t-elle été considérée comme une complication opératoire diminuant la sensibilité de la méthode? Cette sensibilité elle-même, ainsi que nous l'avons montré dans notre travail, peut être très notablement augmentée sans introduire pour cela des complications analytiques notables.

Nous avons alors envisagé la possibilité d'effectuer la séparation quantitative de faibles quantités d'acétone d'un milieu biologique. Nous avons retenu dans ce but la méthode de la distillation et nous avons résolu d'une façon simple ce problème en ce qui concerne des solutions pures d'acétone. Nous avons décrit en détails la

technique originale que nous avons mise au point. Elle consiste à embarrasser l'appareil distillatoire, qui doit être extrêmement petit, par une substance poreuse et inerte dont le but est d'augmenter la surface d'évaporation et d'éviter la formation de mousse.

Nous avons utilisé notre méthode de distillation pour séparer directement l'acétone du plasma. Nous avons vu, au cours de cette partie de notre travail, que cette méthode, très rapide quoique ne mettant en jeu que des manipulations très simples, fournit avec exactitude la valeur, exprimée en acétone, de la somme acétone + acide acétyl-acétique. En se plaçant au point de vue de la biochimie médicale courante, ce résultat est en soi important, car il peut introduire en clinique une donnée nouvelle qui peut se révéler particulièrement importante lorsqu'on se propose d'explorer le métabolisme des glucides et des lipides, principalement en ce qui concerne le diabétique. En effet, les valeurs que nous avons relevées dans la littérature (voir tableau I) montrent des divergences parfois surprenantes par leur importance et qui témoignent des imperfections de certaines méthodes antérieurement proposées.

Nous n'avons pas omis l'intérêt que peut présenter pour le biochimiste une méthode permettant de déterminer avec précision l'acétonémie vraie ou le taux de l'acide β -hydroxybutyrique dans le plasma. Les conditions opératoires que nous préconisons à la suite des travaux de ENGFELDT et de GREENBERG et LESTER rendent possible d'une part la détermination de l'acétonémie vraie (ce qui n'a jamais été effectué chez le sujet sain), d'autre part la détermination du taux de l'acide β -hydroxybuty-

rique dans le plasma par une technique considérablement moins fastidieuse que les méthodes antérieures.

La précision avec laquelle on peut effectuer l'ensemble de ces déterminations est suffisante même quand le plasma ne contient que de faibles quantités de corps cétoènes (voir tableaux IV, V, VI, VII).

Les manipulations qu'entraînent les techniques que nous avons élaborées sont simples; elles permettent l'obtention d'une solution dépourvue de substances susceptibles d'entraver la condensation de l'acétone avec l'aldéhyde furfurylique. En cela nos recherches nous ont permis d'apporter d'utiles perfectionnements techniques à plusieurs méthodes déjà connues. Ces perfectionnements se traduisent par les avantages suivantes:

- notre méthode permet le dosage de 0,2 à 200 microgrammes d'acétone soit en solution pure, soit dans un milieu biologique comme le plasma.
- la précision de notre technique est de ± 1 pour cent en solution pure, de ± 5 pour cent dans un milieu biologique.
- la fidélité est très satisfaisante tant en solution pure que dans le plasma ainsi qu'il ressort de l'accord existant entre plusieurs dosages effectués sur une même solution ou dans le même milieu biologique.
- aucun des temps opératoires n'introduit de sérieuses difficultés et des dosages en série peuvent être aisément réalisés.
- les techniques simples que nous décrivons permet-

tent d'effectuer directement sur un filtrat de déprotéinisation du plasma la détermination de l'acétonémie vraie ou du taux de l'acide β -hydroxybutyrique.

En RESUME, nous pensons que la technique de dosage de l'acétone que nous proposons mérite de prendre rang à côté des meilleures, en ce sens que, ne comportant que des manipulations simples, elle se recommande d'une précision satisfaisante (± 5 pour cent) alliée à une fidélité et une spécificité qui ressortent du travail de biochimie analytique qui a fait l'objet de notre thèse.

En CONCLUSION, nous pensons que l'usage en biochimie analytique de l'ensemble des techniques que nous décrivons pourrait jeter un jour nouveau sur les variations du taux des différents corps cétoènes chez le sujet sain ou diabétique.

BIBLIOGRAPHIE

1. ADAMS, C. A.; NICHOLLS, J. R. — *Bull. Soc. Chim. France*, 1929, **46**, 1.160.
2. AWAD, Y. — *Thèse Pharmacie. Paris*, 1926.
3. BANERJEE, S.; GHOSH, N. C. — *J. Biol. Chem.*, 1949, **177**, 789.
4. BEHRE, J. A.; BENEDICT. — *J. Biol. Chem.*, 1926, **70**, 487.
5. BEHRE, J. A. — *Biol. Chem.*, 1940, **136**, 25.
6. BOUGAULT, J.; GROS, R. — *Bull. Soc. Chim. France*, 1922, **31**, 1.348 et *J. Pharm et Chim.*, 1922, **26**, 7.
7. BRÜGEL, H. G. — *Klin. Wochr.*, 1941, **20**, 89.
8. CANTONI, O. — *Bull. Soc. Chim. France (documents)*, 1935, 228.
9. CHAKRABORTY, M. K.; NATH, M. C. — *Science and culture*, 1947, **12**, 505.
10. CONWAY, E. J. — *Microdiffusion Analysis and Volumetric Errors*, 1950 - Crosby, Lockwood & Sons, Ltd., London.
11. CRANDALL, L. A. — *J. Biol. Chem.*, 1940, **133**, 539.
12. CRANDALL, L. A. — *J. Biol. Chem.*, 1941, **138**, 123.
13. CSONKA, F. A. — *J. Biol. Chem.*, 1916, **27**, 209.
14. DENIGES, G. — *Bull. Soc. Chim. France*, 1898, **19**, 754.
15. DENIGES, G. — *Bull. Soc. Chim. France*, 1899, **21**, 241.
16. DENIGES, G. — *Bull. Soc. Chim. France*, 1902, **27**, 1.
17. EMBDEN, SCHLIEP. — *Zent. Blatt. f. ges. phys. und Pathol. Stoffwechsels*, 1907, n° VII et VIII.
18. ENGFELDT, N. O. — *Zeit. Phys. Chem.*, 1917, **100**, 93.
19. ENGFELDT, N. O. — *Bioch. Zeitschrift*, 1925, **159**, 257.
20. FIESSINGER, N.; OLIVIER, H.; HERBAIN, M. — *Diagnostics biologiques et fonctionnels* 6ème édition p. 454 (Maloine, Editeur, Paris).
21. FLEURY, P.; AWAD, Y. — *J. Pharm. et Chim.*, 1926, **3**, 406 et 449.
22. FLEURY, P.; CARBOU, J. — *J. Pharm. et Chim.*, 1938, **28**, 102.
23. FLOUQUET, M. — *Thèse Pharmacie Lille*, 1943.
24. FOLIN. — *J. Biol. Chem.*, 1907, **3**, 177.
25. FRIEDEMANN, T. — *J. Biol. Chem.*, 1942, **142**, 635.

26. FRIEDEMANN, T.; HAUGEN, G. — *J. Biol. Chem.*, 1943, **147**, 415.
27. FROMMER, V. — *J. Pharm. et Chim.*, 1905, **22**, 411.
28. GILLET, C. — *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 1907, **26**, 278.
29. GREENBERG, L.; LESTER, D. — *J. Biol. Chem.*, 1944, **154**, 177.
30. GRIGNARD. — *Traité de Chimie Organique. T. XVIII*, 129.
31. HAWARY, M.; THOMSON, R. — *Bioch. J.*, 1952, **53**, 340.
32. HAWK, OSER, SUMMERSON. — *Practical Physiological Chemistry*, p. 451. - *The Blackiston Company, New York*.
33. JOLLES, — *Bull. Soc. Chim. France*, 1906, **36**, 1.416.
34. KNOOP. — *Beitr. Chem. Physiol. Pathol.*, 1904, **6**, 150.
35. KORENMANN, I. M. — *Ann. Chim. Anal.*, 1934, **16**, 274.
36. KRAMMER. — *Berichte. Dtsch. Chem. Ges.*, 1880, **13**, 1.000.
37. KROC, P.; LUND, J. — *Acta Physiol. Scand.*, 1946, **12**, 141.
38. LEGAL. — *J. Pharm. et Chim.*, 1888, **18**, 206.
39. LEITER, S. M.; LIRMAN, E. S. — *Vrachebnoc Delo.* 1946, **26**, 116.
40. LIEBEN, A. — *Ann. der Chem. (Suppl.)*, 1880, **7**, 218 et 377.
41. LINDENBERG, A. — *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, 15.
42. LINDENBERG, A. — *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 317.
43. LYNEN, F. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1953, **35**, 1.061.
44. MARRIOTT. — *J. Biol. Chem.*, 1913, 281.
45. MARRIOTT, cité par BLOOR. — *Biochemistry of the Fatty Acids*. p. 328. - *Reinhold publishing company*. 330 W. 42. St. N. Y.
46. MARSH, STRUTHERS. — *Chem. Soc. Proc.*, 1905, 1878.
47. MARTIN, H.; WICK, A. — *J. Clin. Invest.*, 1943, **22**, 235.
48. MAYER, O. — *Ztsch. f. Physiol. Chem.*, 1919, **104**, 220.
49. MESSINGER, J.; HUPPERT. — *Berichte. Dtsch. Chem. Ges.*, 1888, **21**, 3.366.
50. MOURGUE, M. — *Thèse Pharmacie Marseille*, 1944.
51. NADEAU, G. — *Can. Med. Assoc. J.*, 1952, **67**, 158.
52. OKUDA, S. — *J. Oriental Médecine*, 1938, **29**, 86.
53. PENZOLDT, F. — *Ztsch. f. Anal. Chem.*, 1885, **145**, 24.
54. POLONOVSKY, M.; VALDIGUIE, P.; TEYCHENE, — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, **33**, 461.
55. POLONOVSKY, M. — *Biochimie Médicale. 5ème édition (Masson, éditeurs - Paris)*.
56. RAVIN, A. — *Bull. Soc. Chim. France (documents)*, 1937, 213.
57. RIEGLER, E. — *Bull. Soc. Chim. France*, 1901, **26**, 1.062.

58. RIETTI. — *Bull. Soc. Chim. France (documents)*, 1938, 486.
59. SAKAMI, W. — *J. Biol. Chem.*, 1950, **187**, 369.
60. SCOTT, WILSON. — *J. of. Physiol.*, 1911, **42**, 444.
61. SHIPLEY, R. A.; LONG, C. N. H. — *Bioch. J.*, 1938, **32**, 2.242.
62. TEYCHENE, J. — *Thèse Pharmacie Toulouse*, 1953.
63. THIN, C.; ROBERTSON, A. — *Bioch. J.*, 1952, **51**, 218.
64. TOLENTINO, P.; COTELESSA, G.; CAFFARENA, G. — *Minerva Pediatr.*, 1950, **2**, 3.
65. TSCHELINZEFF, W. W.; NIKITIN, E. K. — *Bull. Soc. Chim. France*, 1933, **53**, 1.130.
66. VALDIGUIÉ, P.; MESTRE, — *Ann. Biol. Clin.*, 1945, **3**, 121.
67. VAN-SLYKE, D. — *J. Biol. Chem.*, 1917, **32**, 455.
68. VAN-SLYKE, D. — *J. Biol. Chem.*, 1929, **83**, 415.
69. WEICHSSELBAUM, T.; SOMOGYI, M. — *J. Biol. Chem.*, 1941, **140**, 5.

TABLES des MATIERES

	<u>pages</u>
AVANT-PROPOS	13
INTRODUCTION	15
 <u>CHAPITRE I</u>	
—Dosage de l'acétone en solution pure	19
 <u>CHAPITRE II</u>	
—Détermination de l'acétonémie	30
RECHERCHES PERSONNELLES	39
 <u>PREMIERE PARTIE</u>	
—Dosage de l'acétone en solution pure	41
—Méthode proposée	48
—Sur la distillation des solutions très diluées d'acétone	52
—Mode opératoire	54
 <u>DEUXIEME PARTIE</u>	
Détermination de l'acétonémie	59
—Sur le prélèvement et la conservation de l'échantillon de sang	61
—Sur l'application de la réaction de TSCHELINZEFF et NIKITIN à la détermination de l'acétonémie	61
A) distillation du plasma enrichi en acétone	62
B) distillation du plasma enrichi en acide acétyl-acétique	66
C) distillation du plasma enrichi en acide β -hydroxybutyrique	66
—Sur la détermination de l'acétonémie vraie	68
—Sur la détermination du taux de l'acide β -hydroxybutyrique plasmatique	71
CONCLUSIONS	75
BIBLIOGRAPHIE	81
TABLE DES MATIERES	84

